

## Leuconostoc mesenteroidesにより転位合成された グルコオリゴ糖に関する研究

著者	山内 文男
号	28
発行年	1963
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/12409">http://hdl.handle.net/10097/12409</a>

氏 名・（本籍）	やま　うち　ふみ　お 山　内　文　男（神奈川県）
学 位 の 種 類	農　学　博　士
学 位 記 番 号	農 博 第 2 8 号
学位授与年月日	昭和39年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専門課程	東北大学大学院農学研究科 （博士課程）農芸化学専攻
学 位 論 文 題 目	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> により 転位合成されたグルコオリゴ糖に関する研究
論 文 審 査 委 員	教授（主査）柴　崎　一　雄 教授　　　　　中　西　武　雄 教授　　　　　土　屋　靖　彦

## 論 文 内 容 要 旨

オリゴ糖はその構成している単糖類の種類や、重合度或はその結合型式の相違により構造上から考えられる異性体は非常に多いが、このうち天然物中にその存在が知られて分離確認されたものは極めて僅かである。

そこでこれら多くの未知のオリゴ糖の所在を明らかにし、或は適当な方法により合成を行つて分離し、結晶状に得てその性質を明らかにする事は糖化学上ばかりでなく農産利用学、食品化学的にも非常に有意義と考えられる。

よつて糖転移作用が強い *Leuconostoc mesenteroides* を用いて各種の新オリゴ糖を転移合成し性質を明らかにしようとした。オリゴ糖の生成条件を検討後、グルコニ

糖類 11 種を受容体として培養し、生成するオリゴ糖を分離し構造上興味ある数種の新オリゴ糖を見出した。このことにより二糖類の結合型式と生成したオリゴ糖の構造との関連性が明らかになった。

以上のような各種のオリゴ糖を転移生成する *Leuconostoc mesenteroides* が生成し且つ各種の結合を有するものと推定されている dextran を部分分解して得られるオリゴ糖を分離することにより、転移合成されたオリゴ糖と同種の三糖類と共に数種の三糖類を含め、1, 6- $\alpha$  と 1, 3- $\alpha$  及び 1, 2- $\alpha$  結合からなるすべての組合せのグルコ三糖類を初めて分離することができ、これら三糖類の性質の比較を行った。なおこのことにより従来あまり知られてなかつた dextran の構造解明の手がかりも得られた。

又グルコオリゴ糖の結合型式の基本であるグルコ二糖類のうち、今迄結晶化されなかつた kojibiose 及び nigerose を初めて結晶化する事が出来その性質を明らかにし得た。

## 1 オリゴ糖の生成条件の検討

*Leuconostoc mesenteroides* は sucrose に作用して dextran を生成するが、sucrose に他の糖を添加培養するとオリゴ糖の生成することが知られており、従来までに  $\alpha$  結合二糖類の maltose, isomaltose にはその非還元性末端 glucose に 1, 6- $\alpha$  グルコース転移作用で附加した三糖類が生成し、cellobiose 及び lactose の  $\beta$  結合糖では還元末端に 1, 2- $\alpha$  グルコース転移作用で附加した branched triose の生成することが知られている。

まず菌株による生成糖の相違をみるために Sucrose 2%, lactose 10% を含む培地に、従来用いられてきた *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 株の他に B-1299 及び B (B-421) の三株を用いて生成する三糖類を比較すると、B-512 株及び B 株は 1, 2- $\alpha$  グルコース転移により branched triose を生成し、併せて少量の ketose 含有三糖類を生成するが、B-1299 株は branched triose を殆ど生成せず Ketose 含有糖を多く生成した。

この ketose 含有三糖類は後に構造決定の結果 lactsucrose であることが明らか

となつたが、*Leuconostoc mesenteroides* が糖の還元末端に sucrose 型で fructose 転移を行うということは報告されてなかつた。

次いで B-512 株を用いて lactose の濃度及びそれに対する sucrose の濃度を種々変えて生成するオリゴ糖をみると、sucrose 含量が少ない場合には lactosucrose の生成はみられないが、sucrose の量が次第に多くなり 4% 以上になると B-512 株でも明らかに認められ更に多くなると branched triose 以上に lactosucrose が多く生成することがわかつた。よつてグルコース転移のみを行なわせるには sucrose 含量が 1~2% がよいことが知られた。

## 2 Branched triose 及び kojibiose の分離と結晶化

sucrose に lactose を添加して生成する branched triose は  $O-\beta-D-galactopyranosyl-(1\rightarrow4)-O-[\alpha-D-glucopyranosyl-(1\rightarrow2)]-D-glucose$  なる構造を有し、lactase で分解すると galactose が切れて 1, 2- $\alpha$  結合を有する kojibiose を生成することが報告されている。よつて branched triose を分離して確認すると共に kojibiose の調製のため両者を分離し、精製を繰返し初めて結晶状に得ることが出来その基本的性質が明らかになつた。

B-512 株を培養して得られた branched triose は  $m.p. 174^{\circ}C$  で  $[\alpha]_D = +106^{\circ}$  (水)、元素分析結果は 1 分子の結晶水を有する値と一致した。1 分子の結晶水を有することは  $100^{\circ}C$  で減圧乾燥すると重量が 4% 減少することによつても確かめられた。 $[\alpha]_D$  は溶解直後から次第に上昇し  $[\alpha]_D = +116^{\circ}$  (水) で平衡に達するので還元基は  $\beta$  型である。

branched triose 90g に crude lactase を作用させると数日間で完全に galactose と kojibiose に分解し、活性炭カラムで分離すると 48g の kojibiose が得られる。この kojibiose をメタノールを加え数ヶ月放置すると amorphous 状の白色沈澱を生じたので加熱溶解して冷却すると白色柱状結晶が得られた。

再結晶を繰返すと  $m.p. 187^{\circ}C$  となり、元素分析結果は無水物と一致した。 $[\alpha]_D = +162^{\circ}$  (水) であり  $+137^{\circ}$  で平衡に達するので還元基は  $\alpha$  型である。このことは原糖と同じ還元基の配置をもつ acetate が得られるというビリジン

解媒による低温アセチル化を行うと Kojibiose  $\alpha$ -octaacetate m.p. 162°C が得られることでも確認された。

### 3 lactsucrose の分離と構造決定

$\beta$ -1299 株は fructose を含む三糖類を生成することが明らかにされたので、多量に培養して分離し、構造決定を行つて lactsucrose であることを証明し acetate の結晶として確認した。

sucrose 2%、lactose 10% の培養基 10 ml に  $\beta$ -1299 株を培養して活性炭カラムで分離すると lactsucrose と少量の branched triose が混入する区分が 465 $\mu$  得られた。これを活性炭カラムで再分別して得た lactsucrose の純度の高い区分をアセチル化すると、95% のエタノールから hendecaacetate が結晶化した。再結を繰返すと m.p. 131°C で一定となり元素分析値も一致した。[ $\alpha$ ]<sub>D</sub> = +4.4° (クロロホルム) を示す。この acetate については以前に報告のないものである。

脱アセチルして得た糖を稀酸で部分分解すると lactose と fructose となり完全分解すると glucose、fructose となる。よつて lactose に fructose の附加した三糖類であることがわかる。更にこの糖が非還元性であるという事から、lactose の還元末端の glucose に fructose の還元基が sucrose のように結合したものと推定されるが、このことは過沃素酸酸化法によつて立証され、lactose 中の glucose と fructose とが 1, 2- $\alpha$ ,  $\beta$  結合している lactsucrose: O- $\beta$ -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl  $\beta$ -O-fructofuranoside であることが確認された。

### 4 各種グルコ二糖類の添加培養により得られたオリゴ糖の分離

グルコ二糖類のうち既に trehalose、maltose、cellobiose、isomaltose の 4 種の添加培養による *Leuconostoc mesenteroides* のオリゴ糖生成については報告されているが、他の 7 種についてはまだ報告をみない。

11 種のグリコ二糖類各々を 10%、sucrose 2% 含有する培地に 10 ml に B-512 株を培養して生成したオリゴ糖を調べると、trehalose からは従来の報告と同様にオ

リゴ糖の生成はみられなかつたが、他の10種からはいずれもオリゴ糖が生成した。定量結果では isomaltose からの三糖類の生成率が最も多く27.6%、次いで maltose が16.8%、最低は2~4%であつた。

これらのオリゴ糖を活性炭カラムで分離して構造を検討した。まず  $R_f$  値の  $\log \alpha$  と結合様式との相関関係を適用して構成される結合を調べた結果、添加した糖の結合の他にいずれも1、6結合が順次附加した構造が示された。ただし cellobiose には1、2- $\alpha$ 又は1、4- $\beta$ 結合が附加したとみられる結果を得た。これは1、2- $\alpha$ 結合が還元末端に附加するという報告と一致する。以上の結果は酸部分分解によつて確かめられた。

三糖類の構成する二つの結合が明らかになつたが、いずれの結合が還元末端に属するかを定めるために Anilinhydrogen phthalate による呈色反応、電気泳動法による移動率、還元した糖アルコールの部分分解等を行つて検討の結果、添加した糖の結合は何れも還元末端に含まれることが示された。

以上の結果明らかにされた生成三糖類の構造式を第1表に示す。

第1表 転移合成された三糖類

添加した二糖類	構 造 式
1, 1- $\alpha$ , $\beta$	1- $\alpha$ -isomaltosyl- $\beta$ -glucoside 又は 1- $\beta$ - " - $\alpha$ - "
1, 1- $\beta$ , $\beta$	1- $\beta$ - " - $\beta$ - "
1, 2- $\alpha$	2- $\alpha$ -isomaltosyl glucose
1, 2- $\beta$	2- $\beta$ - " "
1, 3- $\alpha$	3- $\alpha$ - " "
1, 3- $\beta$	3- $\beta$ - " "
1, 4- $\alpha$	4- $\alpha$ - " "
1, 4- $\beta$	2- $\alpha$ , 4- $\beta$ -di-glucosyl glucose
1, 6- $\alpha$	6- $\alpha$ -isomaltosyl glucose
1, 6- $\beta$	6- $\beta$ - " "

非還元性のグルコ三糖類は計算すると32種の異性体が存在する可能性があるが、今迄に1種も見出されておらず、ここに初めて、neo-及びiso-trehaloseに附加した2種の非還元性三糖類が分離された。又gentiobioseに附加した三糖類は1, 6-結合の $\alpha$ と $\beta$ の両方の結合を有する新三糖類である。又1, 1- $\alpha$ 、 $\beta$ 、1, 1- $\beta$ 、 $\beta$ 、1, 2- $\alpha$ 及び $\beta$ 、1, 3- $\alpha$ 及び $\beta$ 、1, 6- $\beta$ 結合の2糖類にglucoseが転移することが初めて確認され、1, 3- $\alpha$ を除いた他の6種から得られた糖はすべて従来未知の三糖類であつた。

生成した三糖類は1, 4- $\beta$ 結合のcellobioseを除いてすべて二糖類の非還元末端glucoseに、1, 6- $\alpha$ 結合でglucose転移が行なわれた。還元末端に1, 2- $\alpha$  glucose転移作用で添加するのは二糖類の $\beta$ 結合に共通の作用でなく、1, 4- $\beta$ 結合のみに起る特異現象であることがわかつた。

## 5 Dextranの分解により得られた1,3- $\alpha$ 結合を含むオリゴ糖の分離

*Leuconostoc mesenteroides* は sucrose から dextran を生成するが菌株によつてその構造が異なり、1, 6- $\alpha$ 結合の主鎖に1, 2- $\alpha$ 、1, 3- $\alpha$ 、1, 4- $\alpha$ の分枝結合が種々の割合で存在することが知らされており、酸分解や加酢分解によつてこれらの結合を含むオリゴ糖として、isomaltoseとそのhigher homologues、kojibiose、nigerose、maltose、3- $\alpha$ -isomaltosylglucoseが分離証明された。

前述のように本細菌の転移作用により多くの新しいオリゴ糖が得られたが、このdextranを部分分解する事により新しいオリゴ糖が得られる事が予想されるので1, 3- $\alpha$ 及び1, 2- $\alpha$ 結合を多く含むdextranを加酢分解して生成するオリゴ糖を分離し構造を明らかにした。

まず1, 3- $\alpha$ 結合を多く含むdextranを生産する*Leuconostoc mesenteroides* B株をsucrose 13%を含む培地45ℓに培養し900gのdextranを得た。これを加酢分解後大型活性炭カラムで分離しnigerose 123gとオリゴ糖64gが得られた。

このオリゴ糖区分を再分別し40のfractionに分け、更に重複するところはセルロースカラム又は濾紙で多量に展開して分離し、borate buffer 及び還元して得た

糖アルコールの molybdate buffer による電気泳動を試み、互に異なる三糖類区分を得、活性炭カラムの溶出順に I、II、III、IV、V とした。収量は II が最も多く次いで III であり I、IV、V は少なかった。

これらの糖について R<sub>f</sub> 値の log α' 及び部分加水分解による構成糖を調べると I は 1, 6-α 結合、V は 1, 3-α 結合のみからなる三糖類であつた。II、III、IV はいずれも 1, 6-α と 1, 3-α 結合を有するが、還元した糖アルコールの部分分解によると夫々 II は 1, 6-α の isomaltose、III は 1, 3-α の nigerose を生じ、IV は二糖類を生じないことから、還元基はそれぞれ II は 1, 3-α、III は 1, 6-α 結合で IV は分枝糖であることがわかる。この結果は電気泳動法による結合の判別とも一致した。これらの構造式を第 2 表に示す。

第 2 表 1, 3-α 結合を含む三糖類

糖	I	II	III	IV	V
構造					
	Isomaltotriose	3-α-Isomaltosylglucose	6-α-Nigerosylglucose	3, 6-di-α-glucosylglucose	Nigerotriose
1, 3-α 結合			1, 6-α 結合		● 還元基

今迄に三糖類として I、II 以外は分離されていない。II、IV、V は従来の文献に記載のない新三糖類であり、I から V 迄は 1, 6-α 及び 1, 3-α 結合からなるすべての組合せの三糖類である。

今迄 dextran 中に 1, 3-α 結合の連鎖は殆どないと報告されているが、V の nigerotriose が分離されたことは dextran の構造において 1, 3-α 結合の少くと



も2個の連鎖があることを直接立証したものである。

## 6 Dextran の分解により得られた 1, 2- $\alpha$ 結合を含むオリゴ糖の分離

1, 2- $\alpha$ 結合を多く含む dextran を生産する B-1299 株を 13% の sucrose を含む培地 30 ml に培養し、dextran 300 g を得、これを加酢分解すると 18 g のオリゴ糖が得られ、活性炭カラムにより再分別し、三糖類とみられる部分を得、溶出順に I、II、III、IV とした。収量は I が最も多く次いで II であり III 及び IV は少なかった。

$\log \alpha'$  及び酸部分分解の結果から IV は 1, 2- $\alpha$ 結合のみからなる三糖類で、I、II、III は 1, 2- $\alpha$ と 1, 6- $\alpha$ の両方の結合を有することが知られた。このうち Anilin hydrogen phthalate による呈色反応をみると、I、III は kojibiose と同じく桃色を示し、II は isomaltose と同じく黒色を示すので、I と III は還元末端に 1, 2- $\alpha$ 結合を含む、II の還元末端は 1, 6- $\alpha$ 結合であると推定された。このことは borate 及び molybdate buffer による電気泳動法、還元した糖アルコールの部分加水分解によつて確かめられ、III は 1, 2- $\alpha$ と 1, 6- $\alpha$ 結合を還元基に有する分枝糖であることがわかった。よつて各三糖類の構造は次の如くである。

I 2- $\alpha$ -Isomaltosyl glucose    III 2,6-di- $\alpha$ -glucosyl glucose  
II 6- $\alpha$ -Kojibiosyl glucose    IV Kojitriose

isomaltotriose を含めると 1, 3- $\alpha$ と 1, 6- $\alpha$ 結合の場合と同様に、1, 2- $\alpha$ と 1, 6- $\alpha$ 結合を含むすべての組合せの三糖類が分離された。これら 4 種はいずれも新三糖類である。

dextran の構造に関しては kojitriose が分離されたことにより、1, 2- $\alpha$ 結合が分枝のみならず連鎖としても存在することを直接示すものである。

三糖類の構造上からみると kojitriose は中間の glucosyl 基の C<sub>1</sub> と C<sub>2</sub> に他の glucose が立体障害なしに隣合つて結合しているものであり、このような構造の存在が可能なことを示している。

## 7 Nigerose の結晶化

1, 3- $\alpha$ 結合を多く含む dextran を加酢分解した際に得られた nigerose は、既に多くの食品や多糖類から分離されてはいるが、今迄遊離糖としては結晶化されず、こゝに初めて結晶化され基本的性質が明らかになった。

今回得られた nigerose は白色の細い柱状結晶で m. p. は  $156^{\circ}\text{C}$  を示し元素分析の結果も無水物と一致した。酸加水分解により 99.8% に相当する glucose が得られ、赤外吸収スペクトルにより結晶水を示す  $1650\text{ cm}^{-1}$  附近に吸収がないことも無水物であることを示している。

旋光度は  $[\alpha]_{\text{D}} = +126.5^{\circ}$  (水) を示し、時間と共に上昇し  $[\alpha]_{\text{D}} = +137^{\circ}$  で平衡に達するので還元基は  $\beta$  型である。ビリジンによるアセチル化によつても  $\beta$ -octaacetate m. p.  $150^{\circ}\text{C}$   $[\alpha]_{\text{D}} = +83^{\circ}$  (クロロホルム) が得られた。結晶の赤外吸収スペクトルには粉末には認められなかつた  $\beta$  型を表わす  $890\text{ cm}^{-1}$  の吸収が認められた。X 線分析によると明瞭な回折図が得られ結晶であることが確認された。

以上 *Leuconostoc mesenteroides* による糖転移作用及び生成する dextran の部分分解によつて得られる多くのオリゴ糖を分離して、糖化学上興味ある 13 種の新三糖類を見出しその構造を決定した。

次いでこれらオリゴ糖の呈色反応、Rf の  $\log \alpha'$ 、活性炭カラムによる溶出順位、電気泳動値を詳細に検討し、オリゴ糖の構造との関連性を明らかにした。

更に *Leuconostoc mesenteroides* の糖転移作用における受容体の結合と生成糖との関連性及び dextran の構造について新たな知見が得られた。

又グリゴ二糖類のうち今迄結晶化されなかつた kojibiose 及び nigerose を初めて結晶状に得た。

## 審 査 結 果 の 要 旨

オリゴ糖はその構成している単糖類の種類や重合度或いはその結合型式の相違により構造上から考えられる異性体は非常に多いが、このうち天然物中にその存在が知られて分離確認されたものは極めて僅かである。これら多くの未知のオリゴ糖の所在を明らかにし或いは適当な方法により合成を行なつて分離し結晶状に得てその性質を明らかにする事は糖化学上ばかりでなく、農産利用学、食品化学的にも非常に有意義である。

本研究は以上のような見地から糖転移作用が強い *Leuconostoc mesenteroides* を用いて、各種の新オリゴ糖を転移合成し性質を明らかにしようとした。まず菌株による生成糖の相違及び糖濃度の影響を検討し、2種の三糖類を得、その1つの branched trioseの精製を繰返して初めて結晶状に得る事が出来、更にラクターゼを用させて得た Kojibiose をも初めて結晶化させる事に成功した。次いで供試菌が糖の還元末端に sucrose 型で fructose 転移を行なう事を見出し、多量に培養して分離し構造決定を行なつて Lactsucrose である事を証明し、アセテートの結晶として確認した。又、11種のグルコ二糖類をそれぞれ 10% sucrose 2% 含有培地に培養して生成したオリゴ糖を活性炭カラムで分離し、種々構造を検討した結果、2種の非還元性三糖類が初めて分離されたばかりでなく、従来未知の7種の三糖類を得た。

供試菌は sucrose から dextran を生成するがこの dextran を部分分解する事により新しいオリゴ糖が得られる事を予想し種々検討実施した結果、5種の三糖類を得、そのうち3種は新しいものであつた。又、多量に得られた nigerose もここに初めて結晶化され基本的性質が明らかにされた。

以上のように *Leuco. mesenteroides* による糖転移作用及び生成する dextran の部分分解によつて得られた多くのオリゴ糖を分離して13種の新三糖類を見出しその構造を決定した事は糖化学上極めて有意義であるばかりでなく、食品化学、農産利用学上にも功績大である。よつて審査員一同は博士の学位を授与するに値するものと判定する。